

⑩ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開
⑫ 公開特許公報 (A) 昭61-132189

⑬ Int. Cl.
C 12 N 15/00
C 07 H 21/02
// C 12 P 21/02

識別記号 厅内整理番号
7115-4B
6742-4C
7235-4B

⑭ 公開 昭和61年(1986)6月19日
審査請求 有 発明の数 2 (全7頁)

⑮ 発明の名称 ダイズ貯蔵タンパク質のメッセンジャーRNAおよびその調製法

⑯ 特願 昭59-254217
⑰ 出願 昭59(1984)12月3日

⑱ 発明者 深澤 親房 茨城県新治郡桜村吾妻2丁目802-203
⑲ 出願人 農林水産省食品総合研究所長
⑳ 代理人 弁理士 久保田 藤郎

明細書

1. 発明の名称

ダイズ貯蔵タンパク質のメッセンジャーRNA
およびその調製法

2. 特許請求の範囲

(1) ダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ダイズ種子より得られ、ショ糖密度勾配遠心法による分画により18Sよりやや重い画分に得られるメッセンジャーRNA。

(2) ダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ショ糖密度勾配遠心法により18Sよりやや重い画分に得られるメッセンジャーRNAをダイズ種子より抽出し分画することを特徴とするメッセンジャーRNAの調製法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ダイズ種子より得られ、ショ糖密度勾配遠心法により18Sよりやや重い画分に得られるメッセンジャーRNA（以下mRNAと略す。）およびその調製法に関する。

ダイズ種子に蓄えられる物質の主なものとしてタンパク質、脂質およびフィチン酸塩などが知られているが、これらの貯蔵物質が種子の登熟過程でどのように合成され、蓄積されるのかを知ることは種子生理学的見地からはもとより食品化学の面からも重要である。

本発明者はダイズ貯蔵タンパク質の生理学的役割、生産方法等について研究を重ねてきたが、その過程においてダイズ種子からダイズ貯蔵タンパク質に対応するmRNAを抽出することに成功し、このmRNAからこれに対応する相補的DNA（以下cDNAと略す。）を調製することに成功した。このようにして得たDNAを微生物細胞内あるいは植物細胞内で発現させることにより目的とするダイズ貯蔵タンパク質を製造することができる。

本発明はダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ダイズ種子より得られ、ショ糖密度勾配遠心法による分画により18Sよりやや重い画分に得られるmRNAおよびその調製法を提供するものである。

本発明のmRNAは、上記したようにダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ショ糖密度勾配遠心法やゲル通過法による分画ならびにアガロース電気泳動法により18Sよりやや重い部分として得られるものであり、このmRNAはダイズ種子より抽出分離することによって製造できる。

本発明に用いるmRNAの材料としては種々の過程、たとえば登熟期にあるダイズ種子を使用できる。

ダイズ種子よりダイズ貯蔵タンパク質に対応するmRNAを抽出するには種子の種類を問わず常法によって行なえばよい。たとえば組織を2~5容のNP-40, SDS, Triton X-100などの界面活性剤とフェノール溶液を混合してホモゲナイザーや凍結融解などの物理的方法を用いて細胞を破碎、可溶化し、遠心した後の上清に冷エタノールを加えてRNAを沈殿させる。

また、必要に応じてダイズ貯蔵タンパク質に対する抗体を用いてダイズ貯蔵タンパク質合成途上のポリソームを沈降せしめ、これによりmRNA

トロでcDNAを合成し、適当なベクターなどに組み込んで微生物あるいは植物等でダイズ貯蔵タンパク質を生産することを可能ならしめることにある。

このようなcDNAの合成は通常、試験管内で次のような方法で行なうことができる。mRNAを誘型としてオリゴdTをプライマーとしてdATP, dGTP, dCTP, dTTPの存在下で逆転写酵素によりmRNAと相補的な单鎖cDNAを合成し、アルカリ処理で誘型mRNAを分解・除去した後、オリゴdCを付加し、次いでオリゴdGをプライマーとして单鎖cDNAを誘型にして逆転写酵素あるいはDNAポリメラーゼを用いて二重鎖cDNAを合成する。このようにして得られたDNA両端を必要によりエキソヌクレアーゼで処理し、それぞれに適当なDNAを接続あるいはアニーリング可能な組合せの塩基を複数個重合せしめる。しかし後、これを微生物ベクターに組み込む。組み込む方法はベクターを適当な制限酵素で切断し、必要により適当なり

を界面活性剤などで抽出する方法を行なうことができる。

また、本発明のmRNAの精製については、オリゴdT-セルロース、ポリU-セファロースなどの吸着カラムによる精製法、等速(isokinetic)なショ糖密度勾配遠心法による分画等によって行なうことができる。このような精製操作により本発明のmRNAは18Sよりやや重い部分として得られる。

上記の如くして得られたmRNAが目的とするダイズ貯蔵タンパク質に対応するものであることを確認するためには、mRNAをタンパク質に翻訳させ、その抗体等を用いてそのタンパク質を同定する等の方法を行なえばよい。たとえばmRNAをタンパク質に翻訳するのによく用いられる系であるReticulocyte-lyzate(網状赤血球ライゼート), Wheat germ(コムギ胚芽)などの無細胞系でタンパク質に翻訳させることが行なわれる。

かくして得られたダイズ貯蔵タンパク質mRNAの最大の利用法は、これらのmRNAよりインビ

ンカーまたはアニーリング可能な組み合せの塩基を複数個重合せしめる。このように加工した二重鎖DNAとベクター-DNAを混合し、リガーゼを用いて接続せしめる。

得られた組み換えDNAはベクターの宿主微生物に導入する。宿主微生物としてはエシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属の微生物、バチルス・ズブチリス等のバチルス属の微生物、サッカロミセス・セレビシエ等のサッカロミセス属の微生物などが好適である。これらの微生物に使用されるベクターを以下に例示する。(蛋白質核酸酵素26巻4号(1981)参照) EK系プラスミドベクター(ストリングエンド型)のpSC101, pRK353, pRK646, pRK248, pDF41等、EK系プラスミドベクター(リラックスド型)のColE1, pVH51, pAC105, RSF2124, pCR1, pMB9, BR313, pBR322, pBR324, pBR325, pBR327, pBR328, pKY2289, pKY2700, pKN80, pKC7, pKB158, pMK2004, pACYC1, pACYC184,

λ d_{ul} 等、 λ gt系ファージベクターの λ gt・ λ c.. λ gt・ λ B、 λ WES・ λ B'、 λ Z Jvir・ λ B'、 λ A L O・ λ B、 λ W E S・T_s622、 λ D_{am}等、シャロンベクターのシャロン4A、シャロン3A、シャロン16A、シャロン13A、シャロン14A、シャロン15A、シャロン8、シャロン10、シャロン17、シャロン20等、チオライス (Tiollais) グループベクターの L512、 λ Z E Q S、 λ Z Y V 5φ、 λ Z U V φ2、 λ Z U V φ3、 λ Y E Q S φ1、 λ Y E Q S φ2、 λ Y E Q S φ3、 λ B_{am}、 λ S_{st}等、枯草菌のプラスミドベクター p T A 1015、p L S 15、p T A 1020、p L S 28、p L S 13、p T A 1050、p T A 1060、p T A 1030、p T A 1031等、スタフィロコッカス由来のプラスミドベクター - p T 127、p C 194、p C 221、p C 223、p U B 112、p U B 110、p S A 0501、p S A 2100、p E 194、p T P 4、p T P 5 等、酵母ベクター p J D B 219、Y E p 13、Y R p 7、Y I p 1、p Y C、p T C 2。微生物のベクター、たとえば p B R 322 などの Pst I あるいは Eco R I site など目的に応じた個

所に組み込み、適当な宿主にトランスポームしてそのダイズ貯蔵タンパク質を宿主内で発現させることができる。

得られたm RNAがダイズ貯蔵タンパク質に対応する遺伝情報を有していることを以下の方法により確認する。

Reticulocyte lysate あるいは Wheat germ の系を用い Positive hybrid selection and invitro translation 法によりダイズ貯蔵タンパク質であることを同定する。

また、植物において T-DNA t_{mr}領域を含む p AL 1050ベクターを用いて遺伝子を植物に導入する。

組み換えDNAを挿入する場合 t_{mr}のリーダー配列に In-frame に接続し、終止コドン領域も t_{mr}のものを利用する。

上述のようにダイズ種子より本発明のm RNAを調製する方法を以下の実施例により詳しく説明する。なお、本実施例に示す以下のダイズ種子より得られる貯蔵タンパク質に対応するm RNAの

場合にも本発明は全く同様に実施できるものであり、本発明の範囲に含まれる。

実施例 1

(1) 完熟ダイズからグリシニン (ダイズ主要貯蔵タンパク質の1つ) を精製し、酸性 (以下、Aと略称する。) サブユニットを分離、精製する。このAサブユニットは分子量約35~40Kで、互いに免疫化学的に強い交叉性を示す。そこで、個々のAサブユニットに特異的な抗血清を調製する。抗血清の調製法としては、たとえば特定サブユニットでウサギに十分免疫 (hyperimmunization) して得た抗血清に、他の酸性サブユニットタンパクの凍結乾燥粉末を加えて吸収操作を繰り返す方法が適用できる。特異性の検定は、オクテルローニイのゲル内二重拡散法とウエスタンプロット法によった。

(2) 登熟中期 (開花後38日目) のダイズ子葉から膜結合型ポリソームを調製し、SDS-フェノール法とポリU-セファロースカラム法でm RNAを精製する。一方、同じ時期の子葉から同様にし

て全m RNAを調製する。この全m RNA標品の一部はショ糖密度勾配遠心法 (ショ糖10% (w/w) ~30% (w/w)) により分画し、赤血球無細胞タンパク合成系における翻訳産物の免疫化学的解析でグリシニンm RNA濃縮画分を同定する。

(3) 上記 (2) の全m RNAに対するc DNAライブラリーを以下に記述する方法に従って作製する。

1) ss-c DNAの合成と雑型m RNAのアルカリ分解シリコナ化したエッペンドルチューブ (1.5ml) に 10μl の X10 c DNA緩衝液 (0.5Mトリス-塩酸、1.4M塩化カリウム、0.8M酢酸マグネシウム)、3μl の RNasin (生化学工業40u/μl)、5μl の dATP、5μl の dGTP、4μl の dCTP およびdTTP、24μl のオリゴ(dT)₁₂₋₁₈ (P-L Biochemicals 社製、0.2mg/ml)、8μl のアクチノマイシンD (0.4μg/μl)、1μl の 0.1M DTT、6μl の (α -³²P)dATP および 10μl の m RNA (1μg/μl、65°C、10分間処理した

後、急冷したもの)をこの順番に加えて混合して1秒間遠心し、液を底に集める。

42℃で2分間保温し後、20μlのAMV逆転写酵素を加えて軽く混合し、1秒間遠心してこの混液(100μl)を42℃で60分間保温する。

反応液に20μlの5M塩化ナトリウム、16μlの250mMEDTA、2μlの20%SDSおよび62μlの蒸留水を加えて反応を止める。

これにフェノール混液(10mMトリス-塩酸(pH8.3)-2mMEDTAで飽和したフェノール液)200μlを加えて微しく振盪する。

遠心して水層をとり、残りのフェノール層に122μlの蒸留水、48μlの5M塩化ナトリウム溶液を加えて再抽出し、先の水層と合わせてエーテル処理をして混入したフェノールを除去した後、30μlの酢酸カリウム(pH5.0)と600μlの冷エタノールを加えてエタノール沈殿する(ドライアイス-エタノール中で30分間または-70℃で1時間)。

この操作により約3~5μgのcDNAが得ら

れる。このss-cDNAを減圧乾燥し、45μlの蒸留水を加えて溶解する。

これに5μlの5N水酸化ナトリウム溶液を加えて混合し、1秒間遠心して液をチューブの底に集めて25℃で一晩保温し、mRNAを分解する。

50μlのHepes-KOH(pH7.4)緩衝液を加えた後、ウルトロゲルAcaA44のカラム(ゲルベットの高さ28cm)にのせて約0.6mlずつ分画する。void volume 西分(この条件ではフラクション番号6~8、GMサーベイメーターでチェックまたは液体シンチレーションカウンターを用いてCerenkov法で測定)を集め。

この西分に1/10容量の3M酢酸カリウム、2倍量の冷エタノールを加えて-70℃で1時間放置後遠心沈殿させ、2回70%エタノールで沈殿物を洗い(沈殿物をはがさないように静かにエタノールを重層し、10分間遠心しながらrinseする)、減圧乾燥する。

ii) ss-cDNAの3'-OH末端へのdCホモポリマーの付加

i) で調製乾燥したss-cDNA(シリコナイズしたエッペンドルフチューブに入っている)に25μlの蒸留水を加えて溶解し、遠心して底に集めて65℃で10分間処理し、急冷する。再び1秒間遠心し、これに5μlのX10TdT緩衝液(1.4Mカコジル酸カリウム(pH7.6)、0.6Mトリス塩基(19.3gのカコジル酸(free acid)と7.2gのトリズマ・ベース(Sigma社製)を50mlの再蒸留水に溶かし、水酸化カリウムの粉末を加えてpHを7.6に調整、滅菌する)、5μlの塩化コバルト、5μlのDTTおよび5μlのdCTPを加え十分に混合し遠心する。

これに5μlのTdT(4u/μl)を加えて軽く混合し、15℃で10分間保温する。この反応混液に10μlの5M塩化ナトリウム、4μlの250mMEDTA、36μlの蒸留水を加え70℃で5分間熱処理する。

フェノール抽出後エタノール沈殿、洗浄後乾燥する。

iii) ds-cDNAの作製

上記ii)で作製した3'末端にdCホモポリマーを付加したss-cDNA標品(シリコナイズしたエッペンドルフチューブ中で乾燥保存したもの)に26μlの蒸留水を加えて十分に溶解し、68℃、5分間処理後急冷する。

1秒間遠心後、10μlのX10cDNA緩衝液、1μlのDTT、10μlのdATP、dGTP、dCTPおよびdTTP、15μlのオリゴ(dG)₁₃を加えて混合後遠心し、次いで13μlの逆転写酵素(5.8u/μl)を加えて42℃で1時間保温する。

反応液に20μlの5M塩化ナトリウム、8μlの250mMEDTA、2μlの20%SDSおよび70μlの蒸留水を加えて反応を停止させる。

常法に従ってフェノール抽出、エタノール沈殿、洗浄および乾燥後、40μlの蒸留水を加えて溶解し、62℃、5分間処理後急冷し、遠心する。

これにX10Klenow緩衝液(0.67mMK-リン酸緩衝液(pH7.4)、67mM塩化マグネシウム、10mMDTT)を10μl、dATP、dGTP、

d C T P および d T T P の各 $10 \mu\ell$ ずつを加えてよく混合した後、DNAポリメラーゼ I (Klenow 酵素, $5 \text{ u} / \mu\ell$) を $10 \mu\ell$ 加えて 37°C で 1 時間反応させる。

$40 \mu\ell$ の 5 M 塩化ナトリウム, $16 \mu\ell$ の 250 mM EDTA, $4 \mu\ell$ の 20% SDS および $140 \mu\ell$ の蒸留水を加えて反応を止めた後、フェノール抽出、エタノール沈殿を常法に従って行なう。必要とあれば、この段階でゲル電気泳動または中性シス糖密度勾配法により低分子の ds - c DNA を除去することもできる。

ds - c DNA に $100 \mu\ell$ の蒸留水を加えて溶解し、ウルトロゲル A c A 44 のカラム (ゲルベッドの高さ 28cm) にのせて約 $0.6 \mu\ell$ ずつ分画し void volume 西分を集める (溶出パターンは液体シンチレーションカウンターを用いた Gerasenov 法で測定する)。

この西分に $1/10$ 量の 3 M 酢酸カリウム、2倍量の冷エタノールを加えて -70°C で 1 時間放置後、生じた ds - c DNA の沈殿を遠心乾燥により回

ゴ (d G), ~~restated~~ を加えて混合し、 68°C 、5 分間処理した後、 43°C にした恒温水槽中に移し 2 時間保溫する。

恒温槽のスイッチを切り、少なくとも 2 時間以上 (一晩そのまましておいてもよい) 放置して室温まで下げた後、チューブを 4°C に保存する。

vi) 形質転換 (トランスフォーメーション)

Dagert と Ehrlich の方法により RR 1 を宿主として $8.2 \times 10^6 \sim 1.4 \sim 10^7$ 個形質転換株/ μg pBR 322 DNA の転換効率を得た。

(4) (2) のグリシニン中間サブユニット mRNA の濃縮画分に対する ^{32}P 標識 c DNA を作製しプローブとする。

(5) 上記 (4) で作製したプローブを用いて (3) の c DNA ライブライリーの中からグリシニンサブユニットクローニングをコロニーハイブリダイゼイション法で選別する。1023個のクローニングのうち 22 個が陽性であった。

6) 上記 (5) で得た 22 個のクローニングの中から挿入部分の長さが 1 kb 以上のクローニング (16 個) を選

り、洗浄、減圧乾燥する。

iv) プラスマドへ挿入のための ds - c DNA の末端加工

上記 (3) で調製した ds - c DNA に $37 \mu\ell$ の蒸留水を加えて溶解し、 $5 \mu\ell$ の X10 T d T 細胞液、 $5 \mu\ell$ の d C T D を加えて十分混合した後、 $3 \mu\ell$ の T d T を加えて 37°C で 5 分間保溫する。

反応後、 $10 \mu\ell$ の 5 M 塩化ナトリウム、 $4 \mu\ell$ の 250 mM EDTA および $36 \mu\ell$ の蒸留水を加えて 70°C で 5 分間処理した後、常法に従ってフェノール抽出、エタノール沈殿、洗浄および減圧乾燥を行なう。

v) PstI 切断 3' 末端オリゴ d G 付加 p BR 322 とのアニーリング

ds - c DNA 溶液 ($450 \mu\ell$) に $50 \mu\ell$ の X10 アニーリング緩衝液 (0.1 M トリス - 塩酸 (pH 7.5), 1 M 塩化ナトリウム, 10 mM EDTA) を加えて十分混合し、その $100 \mu\ell$ をとりエッペンドルフチューブ (1.5 ml, シリコナライズしたもの) に入れる。これに $1 \mu\ell$ の p BR 322 (オリ

ビ "positive hybrid selection and invitro translation" 法によりグリシニン c DNA クローンを同定した。このうちの 1 つは約 2 kb の挿入部分を持っていた。このクローンをプローブとしたノーザンプロットハイブリダイゼイションの結果からグリシニン mRNA の長さは約 2.2 kb であり、作製された c DNA は完全長に近い。

クローニングした c DNA のうちの一つグリシニン A, B, サブユニット c DNA の構造は第 1 表の通りであった。

実施例 2

実施例 1 と同様の方法で得られたもう一つのグリシニン A, A, B, サブユニット c DNA の構造は第 2 表の構造であった。



第 1 巻

(ダイズグリシニンA、B、cDNAの塩基配列)

(ダイズグリシン A, A', B, cDNA の塩基配列)

GUAAGACGluAGATGCTG880
 GATGAA890
 GATGAA900
 GATGAA910
 GATGAA920
 GATGAA930
 GATGAA940
 GATGAA950
 GATGAA960
 GATGAA970
 GATGAA980
 GATGAA990
 GATGAA1000
 GATGAA1010
 GATGAA1020
 GATGAA1030
 GATGAA1040
 GATGAA1050
 GATGAA1060
 GATGAA1070
 GATGAA1080
 GATGAA1090
 GATGAA1100
 GATGAA1110
 GATGAA1120
 GATGAA1130
 GATGAA1140
 GATGAA1150
 GATGAA1160
 GATGAA1170
 GATGAA1180
 GATGAA1190
 GATGAA1200
 GATGAA1210
 GATGAA1220
 GATGAA1230
 GATGAA1240
 GATGAA1250
 GATGAA1260
 GATGAA1270
 GATGAA1280
 GATGAA1290
 GATGAA1300
 GATGAA1310
 GATGAA1320
 GATGAA1330
 GATGAA1340
 GATGAA1350
 GATGAA1360
 GATGAA1370
 GATGAA1380
 GATGAA1390
 GATGAA1400
 GATGAA1410
 GATGAA1420
 GATGAA1430
 GATGAA1440
 GATGAA1450
 GATGAA1460
 GATGAA1470
 GATGAA1480
 GATGAA1490
 GATGAA1500
 GATGAA1510
 GATGAA1520
 GATGAA1530
 GATGAA1540
 GATGAA1550
 GATGAA1560
 GATGAA1570
 GATGAA1580
 GATGAA1590
 GATGAA1600
 GATGAA1610
 GATGAA1620
 GATGAA1630
 GATGAA1640
 GATGAA1650
 GATGAA1660
 GATGAA1670
 GATGAA1680
 GATGAA1690
 GATGAA1700
 GATGAA1710
 GATGAA1720
 GATGAA1730
 GATGAA1740
 GATGAA1750
 GATGAA1760
 GATGAA1770
 GATGAA1780
 GATGAA1790
 GATGAA1800
 GATGAA1810
 GATGAA1820
 GATGAA1830
 GATGAA1840
 GATGAA1850
 GATGAA1860